

氏 名	安 和 容
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第3183号
学位授与の日付	平成18年 3月24日
学位授与の要件	自然科学研究科生命分子科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Study on development of new expression vector to host lactobacilli isolated from human intestinal tract (ヒト腸管由来乳酸桿菌を宿主とする新規な発現ベクターの開発 に関する研究)
論文審査委員	教授 宮本 拓    教授 泉本 勝利    教授 坂口 英

#### 学位論文内容の要旨

本研究ではヒト腸管由来 *Lactobacillus casei* を宿主とした新規な発現ベクターの開発を目的とした。すなわち、*Lactobacillus casei* L-49 から分離したプラスミド pLC494 の塩基配列を分析し、pLC494 上の有用な遺伝子、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* NIAI N-7 のプラスミドに支配されているクエン酸代謝関連遺伝子および *Streptococcus bovis* 148 に由来する  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を利用した発現ベクターの構築を目指した。

まず、ヒト乳幼児糞便から分離した *Lactobacillus casei* L-49 に由来するプラスミド pLC494 の塩基配列を分析した結果、pLC494 は全長約 8.8kb で GC 含量 41.5% であり、オープンリーディングフレーム (ORF) を 9 個保有している事が認められた。そのうち ORF4 の複製タンパク質 A (*repA*) とその上流域にある繰り返し領域 (*ori*) を利用して、乳酸菌・大腸菌のためのシャトルベクター pJLE4942 を構築した。

次に、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* NIAI N-7 からのプラスミド pCM1 に支配されているクエン酸パーミターゼ遺伝子を利用して組み換えベクター pJLECit を構築した。ベクター pJLECit の発現がみられた *Lactobacillus casei* L-49-4 (L-49 株のプラスミドフリー株) の形質転換体は、pH 8.5 におけるクエン酸の取り込みとジアセチル/アセチン生産が最も高かった。

また、*Streptococcus bovis* 148 由来の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、pLC494 由来のプロモータ *Prep*, *ori* および *repA* を利用して発現ベクター pJLEamy を構築した。発現ベクター pJLEamy が導入された大腸菌および *Lactobacillus casei* L-49-4 では  $\alpha$ -アミラーゼの活性が認められた。

以上のように、ヒト腸管由来 *Lactobacillus casei* における有用な宿主・ベクター系が確立された。これらの研究成果は、今後、プロバイオティクス乳酸菌の改良に必須とされるフードグレードベクターの開発に資するところが大いと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

本研究ではヒト腸管由来 *Lactobacillus casei* を宿主とした新規な発現ベクターの開発を目的とした。すなわち、*Lactobacillus casei* L-49 から分離したプラスミド pLC494 の塩基配列を分析し、pLC494 上の有用な遺伝子、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* NIAI N-7 のプラスミドに支配されているクエン酸代謝関連遺伝子および *Streptococcus bovis* 148 に由来する  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を利用した発現ベクターの構築を目指した。

まず、ヒト乳幼児糞便から分離した *Lactobacillus casei* L-49 に由来するプラスミド pLC494 の塩基配列を分析した結果、pLC494 は全長約 8.8kb で GC 含量 41.5%であり、オープンリーディングフレーム (ORF) を9個保有している事が認められた。そのうち ORF4 の複製タンパク質 A (*repA*)とその上流域にある繰り返し領域 (*ori*)を利用して、乳酸菌・大腸菌のためのシャトルベクター pJLE4942 を構築した。

次に、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* NIAI N-7 からのプラスミド pCM1 に支配されているクエン酸パーミラーゼ遺伝子を利用して組み換えベクター pJLECit を構築した。ベクター pJLECit の発現がみられた *Lactobacillus casei* L-49-4 (L-49 株のプラスミドフリー株) の形質転換体は、pH8.5 におけるクエン酸の取り込みとジアセチル/アセトイン生産が最も高かった。

また、*Streptococcus bovis* 148 由来の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、pLC494 由来のプロモータ *Prep*, *ori* および *repA*を利用して発現ベクター pJLEamy を構築した。発現ベクター pJLEamy が導入された大腸菌および *Lactobacillus casei* L-49-4 では  $\alpha$ -アミラーゼの活性が認められた。

以上のように、ヒト腸管由来 *Lactobacillus casei* における有用な宿主・ベクター系が確立された。これらの研究成果は、今後、プロバイオティクス乳酸菌の改良に必須とされるフードグレードベクターの開発に資するところが大きいと考えられる。従って、学位審査委員会は、本論文が博士(学術)の学位に値するものであると判定した。